

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4738325号  
(P4738325)

(45) 発行日 平成23年8月3日 (2011.8.3)

(24) 登録日 平成23年5月13日 (2011.5.13)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/49 (2006.01)

GO 1 N 33/49 H

GO 1 N 21/49 (2006.01)

GO 1 N 33/49 G

GO 1 N 33/49 B

GO 1 N 21/49 Z

請求項の数 11 (全 26 頁)

|               |                               |           |                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2006-502985 (P2006-502985)  | (73) 特許権者 | 501341521           |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年1月22日 (2004.1.22)        |           | クオリジエン・インコーポレイテッド   |
| (65) 公表番号     | 特表2006-518462 (P2006-518462A) |           | アメリカ合衆国、カリフォルニア・920 |
| (43) 公表日      | 平成18年8月10日 (2006.8.10)        |           | 09、カールズバッド、コルテ・デル・ノ |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2004/001982             |           | ガール・2042            |
| (87) 国際公開番号   | W02004/073486                 | (74) 代理人  | 100062007           |
| (87) 国際公開日    | 平成16年9月2日 (2004.9.2)          |           | 弁理士 川口 義雄           |
| 審査請求日         | 平成18年10月11日 (2006.10.11)      | (74) 代理人  | 100114188           |
| (31) 優先権主張番号  | 10/371,837                    |           | 弁理士 小野 誠            |
| (32) 優先日      | 平成15年2月20日 (2003.2.20)        | (74) 代理人  | 100140523           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 渡邊 千尋           |
|               |                               | (74) 代理人  | 100119253           |
|               |                               |           | 弁理士 金山 賢教           |
|               |                               | (74) 代理人  | 100103920           |
|               |                               |           | 弁理士 大崎 勝真           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

流体として不連続な複数のコンパートメント（前記複数のコンパートメントは、サンプル反応コンパートメント、それぞれ第1および第2の試薬コンパートメントに含まれている第1および第2の異なる試薬およびシグナル検出コンパートメントを含む。）を有する容器を提供すること；

細胞含有サンプルを、前記サンプル反応コンパートメント内に収容すること；

前記容器内の細胞含有サンプルを照射し、光散乱シグナルを創製し、光散乱シグナルを読み取ること；

前記容器表面を複数のアクチュエータを有する装置に接触させること；

変更可能な順序および時間差で第1および第2の試薬を独立してサンプルに加えるように、複数の異なるセットのアクチュエータを操作すること；

アクチュエータセットの少なくとも1つを用いて前記サンプル反応コンパートメントと前記サンプル検出コンパートメントとの間に反応済みサンプルの少なくとも一部を移動させること；

前記サンプル検出コンパートメントに含まれている反応済みサンプルから検体依存シグナルを読み取ること、および

検体依存シグナルならびに光散乱シグナルを用いて試験結果を算出することを含む検体に関して細胞含有サンプルを試験する方法。

【請求項 2】

10

20

前記算出ステップが、光散乱シグナルと細胞含有サンプル中のヘマトクリット濃度とを相関させることを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記照射ステップが、アクチュエータの 1 つに配置された光ガイドを用いて実施される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記光散乱シグナルを読み取るステップが、アクチュエータの 1 つに配置された他の光ガイドを用いて実施される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記照射ステップが、620nmと660nmとの間に最大波長を有する光を用いて実施される請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記容器が、可撓性上部シートおよび可撓性下部シートを有し、前記コンパートメントの少なくとも 1 つが、前記可撓性上部シートおよび下部シートにより形成され、前記可撓性上部シートおよび下部シートの少なくとも一部が透明である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

複数のコンパートメント（前記複数のコンパートメントは、サンプル収容コンパートメントおよびシグナル検出コンパートメントを含み、前記コンパートメントの少なくとも 1 つが試薬を含む。）に流体連結された反応チャネルを有する容器を提供すること；

細胞含有サンプルを、前記サンプル収容コンパートメントに導入すること；

20

前記容器内の細胞含有サンプルを照射することによって、光散乱シグナルを創製し、その光散乱シグナルを読み取ること；

前記容器表面の第 1 の部分を、アクチュエータの少なくとも 1 つが、容器の一部を圧縮することにより、サンプルの少なくとも一部を反応チャネルに移動させる複数の独立して操作可能なアクチュエータを有する装置と接触させること；

容器の一部を圧縮することにより、サンプルの少なくとも一部および前記試薬が複数のコンパートメントの少なくとも 2 つの間を移動することを防止するアクチュエータの他の 1 つと前記容器表面の第 2 の部分とを接触させること；

前記複数のアクチュエータを用いて、前記サンプル収容コンパートメントとサンプル検出コンパートメントとの間の一方向移動および二方向移動の少なくとも 1 つの移動においてサンプルの一部を移動させること；

30

前記容器に備えられたシグナル検出器を用いてシグナルを検出すること；および  
シグナルおよび光散乱シグナルを用いて細胞含有サンプルに関する試験結果を算出すること

を含む容器を操作する方法。

【請求項 8】

前記算出ステップが、光散乱シグナルと細胞含有サンプル中のヘマトクリット濃度とを相関させることを含む請求項 7に記載の方法。

【請求項 9】

前記照射ステップが、アクチュエータの 1 つに配置された光ガイドを用いて実施される請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記光散乱シグナルを読み取るステップが、アクチュエータの 1 つに配置された他の光ガイドを用いて実施される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記照射ステップが、620nmと660nmとの間に最大波長を有する光を用いて実施される請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明の分野は、臨床診断法およびバイオテクノロジーである。

【背景技術】

【0002】

疾患を確認し、治療するインビトロ診断試験は、病院、家庭および医師のオフィスにおいて一般的な手段となっている。血液、時に血液を含有し得る尿または脳脊髄液などの生体液は、このような試験に関して最も頻繁に用いられる生体サンプルである。

【0003】

血液は、多くの異なる成分を含有しており、これらの幾つかは、サンプル毎に著しく異なった濃度で存在する。全血中、赤血球および白血球双方のパーセンテージは、例えば、正常な個人の間で、さらには同じ個人においても経時的に、特に病的状態下で変化し得る。保存条件、凝固、および赤血球細胞の脆弱性などの他の因子と結びついたこの大きな変化は、血液含有サンプルを用いて診断を実施する上でかなりの技術的問題を生じている。

10

【0004】

全血は、通常、試験前に種々のフラクシオンに分離される。とりわけ、フラクシオンへの分離は、ヘマトクリット値における相違を有利に補正でき、他の方法では上流または下流の生化学的アッセイにおける潜在的干渉を減じることができる。しばしば使用されるフラクシオンは、血清、血漿、白血球細胞、赤血球細胞および血小板である。用語の「血漿」および「血清」とは、細胞成分の実質的部分が除かれた全血に由来する任意の液体を意味するために本明細書で用いられる。血液凝固剤の有無は重要な因子ではないので、血漿および血清は、本明細書において交換可能で使用される。

20

【0005】

血液分離法は、3つのカテゴリー、すなわち、遠心分離、ろ過、および固相分離に概念的に分類できる。

【0006】

遠心分離

血液分離は、遠心分離によりルーチン的に達成される。遠心分離が一般に望ましい。なぜならば、(1) 遠心分離は、95%超の効率で血清または血漿から細胞成分を一般に分離でき；(2) 遠心分離は、操作のために高度に訓練された作業員を必要とせず；および(3) 遠心分離は、15分以下で複数サンプルの同時処理を可能にするからである。しかしながら、血液の遠心分離には問題もある。例えば、遠心分離機は高価であり、複数のステップを含み、ベッドサイド、学校または家庭などでのケア箇所で利用できないことが多く、また通常、操作のために電力を必要とする。

30

【0007】

ろ過

血液から種々の成分を分離するために多くのろ過法が知られている。例えば、Allenらに対する米国特許第4,987,085号は、ガラス繊維膜およびセルロース膜の組合せを用いて孔径を下げたろ過システムを記載している。Hillmanらに対する米国特許第4,753,776号は、細胞流動を遅らせるために毛細管力を用いるガラスマイクロ繊維フィルタを開示している。Kondoらに対する米国特許第4,256,693号は、粉末または紙、不織布、人造繊維またはガラス繊維などの繊維から構成されるシート様フィルタ材料から選択された少なくとも1つの成分から作製されたフィルタ層を備えた多層の化学分析用要素を開示している。米国特許第3,663,374号および米国特許第4,246,693号は、全血から血漿を分離するための膜フィルタを開示しており、米国特許第3,092,465号、米国特許第3,630,957号、米国特許第3,663,374号、米国特許第4,246,693号、米国特許第4,246,107号、米国特許第2,330,410号は、さらなるろ過システムを開示しており、それらの幾つかは、小孔膜を使用している。

40

【0008】

知られたろ過技法は一般に、必要とされる血液容量をほんの2,3滴に減少させている。したがって、多くのろ過試験では、約25μlから75μlのみの全血を用いることが

50

考慮されている。さらに、約  $5 \mu\text{l}$  から  $50 \mu\text{l}$  のみの全血を必要とするろ過法も幾つか開発されている。大部分の適用において、ろ過は、ろ過表面が、反応ゾーンまたはストリップのゾーンに置かれる試験ストリップ上に直接生じる。これらの様式におけるろ過はまた、遠心分離機に伴う利用可能性の問題を減じるか、または除外する。

#### 【0009】

しかし、これらの進歩が、全体的に新たな問題を引き起すことが多い。例えば、フィルタは、かなりの量の血漿を保持する傾向があり、低濃度で存在する検体は、小容量の血液から由来する血清中で検出することが困難であることが多い。既存のフィルタはまた、詰まって、望ましくないほど遅い流速となる傾向がある。詰まりを減じ、流速を改善するために凝集剤が、しばしば全血と混合されるが（米国特許第5, 262, 067号、米国特許第5, 766, 552号、米国特許第5, 660, 798号および米国特許第5, 652, 148号を参照）、依然としてこれらの問題は残る。

10

#### 【0010】

フィルタに対して用いられた力を変更することにより流速を改善する努力がなされてきた。しかし、選択の余地はかなり制限されている。フィルタ類は、製造および使用が比較的簡単であるが、赤血球細胞の過度の溶血を引き起す傾向がある。毛細管作用、すなわち水または液体が、互いに対して、また毛細管壁に対する液体中の分子引力の結果、通常の液体レベル以上に上昇する現象もまた利用できる。しかしながら、毛細管作用は一般に、大容量の迅速な分離を達成するには弱すぎる。（米国特許第5, 660, 798号、米国特許第5, 652, 148号および米国特許第5, 262, 067号を参照）。さらに毛細管作用による血漿の分離では、吸上げ膜内、または採取膜内に比較的大量の液体が保持される傾向がある。これにより次に、吸上げ膜もしくは採取膜または両方を試験すること、またはこれらの膜から保持された物質を溶出することが必要となり得る。

20

#### 【0011】

##### 固相分離

固相分離は典型的に、標的物に対する結合を有する表面、すなわちサンプルからの標的物を固定化し、除去するために作用する表面を有する。代表的な固相分離法は、結合クロマトグラフィ、ビーズを用いる結合分離、および中空繊維分離である。

#### 【0012】

固相分離の特に有利なタイプの1つは、標的物が、磁氣的に誘引可能な（常磁性）ビーズにより捕捉される磁気的分離である。ろ過分離の場合のような物理的障壁が存在しないことから、磁気分離は、比較的緩やかな傾向がある。Lansdorpに対する米国特許第5, 514, 340号およびCarewに対する米国特許第5, 123, 901号において、例えば、磁気ワイヤは、液体から磁気粒子を分離するためのバッチ処理において使用される。Kellandらに対する米国特許第4, 663, 029号およびWangに対する米国特許第5, 795, 470号において、磁気粒子は、連続フロー処理において液体から分離される。例えば、Moubayedに対する米国特許第5, 536, 475号に公表されたさらなる他の方法は、ロッキング分離チャンバおよび複数磁石を使用して、液体から磁気粒子を分離する。

30

#### 【0013】

知られた磁気分離を血液分離に適用する主要な制限の1つは、種々のタイプの細胞および細胞下粒子の全てを除去するために、複数の抗リガンドが必要であることである。赤血球、リンパ球、単球、および血小板は、例えば、種々の表面抗原を有し、任意の1抗体に特異的に結合することがない。さらに、病的状態、遺伝病もしくは遺伝的変異または細胞のライフサイクルのための細胞上のリガンドの欠如または不在により、抗リガンドが標的細胞と結合する効率性が一般に減少する。

40

#### 【0014】

知られた磁気分離装置に伴う問題は、サンプル容量の増加、特に1ミリリットルを超えるサンプル容量により悪化することである。多くの診断適用は、複数試験または複数試験バッテリーの要件を満足させるために1ミリリットルまでの血清容量とすることが必要なこ

50

とから、磁気分離は、格別有用ではなかった。さらに、グルコース試験またはヘモグロビン試験などのアッセイは、蛋白質、ビリルビン、および薬物を含むサンプルにおける生体物質または化学物質により引き起される干渉に対して感受性が高い。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

したがって、血液をその構成部分に分離するため、特に全血から血漿または血清を分離するための改良方法および改良装置を提供する必要性は依然として存在している。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明によれば、細胞含有サンプルを、添加剤と粒子の双方とサンプルを混合することにより細胞含有ネットワークを調製し、および、磁力を用いて残りの実質的に細胞除去部分から前記ネットワークを分離することにより、細胞含有サンプルは細胞含有部分と実質的に細胞除去部分とに分離される。

【0017】

好ましい実施形態の一態様において、容器は、複数の密封壁を有しており、密封壁の少なくとも1つは可撓性である。前記サンプルは、密封壁内に保持され、好ましくは全血を含んでおり、細胞含有部分は、主として相互結合の赤血球、幹細胞、白血球、またはリンパ球を含んでいる。特に、好ましいリンカーとしては、単離または分離される細胞の細胞膜上または細胞膜内のリガンドまたは抗原に結合する第一次抗体、および第一次抗体に結合する第二次抗体などの抗リガンドが挙げられる。好ましい実施形態の他の態様において、第一次抗体は、サンプルに直接添加され、第二次抗体は、常磁性ビーズの表面に結合される。

【0018】

好ましい実施形態の他の態様において、Polybrene（登録商標）、カチオン性リポソーム類、カチオン性脂質類、およびポリデンドロマー類などのポリマー材料を、抗リガンド（類）および磁気分離と組み合わせて、もしくは抗リガンド（類）およびろ過と組み合わせて使用できる。アダプター類は、それら自体で、またはカチオン性ポリマー類、カチオン性リポソーム類、およびデンドロマー類と組み合わせて使用できる。

【0019】

好ましい実施形態のさらなる他の態様において、分離は、密封壁内で行われ、幾つかの実施形態において、分離には、少なくとも一部において、磁力が使用されるが、他の実施形態においては、実質的に細胞除去部分からネットワークを分離するために少なくとも2つの力が使用される。2つの力が、分離のために使用される場合、1つの力は磁力であり、他の力は、少なくとも1つの密封壁を介して伝達される電気機械力であり、用語の「電気機械的」、「自動的」、「油圧式」および「空気圧式」は、本明細書において交換可能に使用される。

【0020】

本発明の種々の目的、特徴、態様および利点は、同様の数字が同様の構成部品を表している添付の図面と一緒に、本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

【0021】

（図面の簡単な説明）

図1Aは分離剤が、血液サンプルに加えられている好ましい実施形態を示す図である。

図1Bは赤血球分離後の図1Aの実施形態を示す図である。

図2Aは代替の実施形態を示す図である。

図2Bは図2Aの実施形態に存在すると考えられる結合相互作用を示す図である。

図3は他の代替の実施形態を示す図である。

図4は代表的な診断容器を示す平面図である。

図5は図4の診断容器に関する代表的な分析器を示す斜視図である。

図6は照射用の光ガイドおよび散乱光の読取りを含むアクチュエータを備えた代表的な分析器の詳細図を示す写真である。

図7Aは本発明の主題による分析器を用いて得られた反射シグナルに対して測定されたヘマトクリット値の検量線を示すグラフである。

図7Bは回転ヘマトクリット値と本発明の主題による分析器において反射シグナルを用いて決定されたヘマトクリット値との間の相関を示すグラフである。

図8Aは種々の実験パラメータを用いたPSA測定値を示すグラフである。

図8Bは本発明の主題による分析器を用いて得られた反射シグナルを用いる全血のPSA測定値と予め調製された血漿のPSA測定値との間の相関を示すグラフである。

#### 【0022】

10

(具体的実施形態の詳細な説明)

図1Aの一般化された好ましい実施形態において、血液分離装置10は、容器20と磁石50とを含む。容器20は、細胞に実質的な結合能を有する第一次抗体42、および第一次抗体42に実質的な結合能を有する第二次抗体でコーティングされた粒子40が添加されている血液30を含有する。

#### 【0023】

容器20は、バキュテナ(vacutainer)管またはファルコン管などの通常の試験管または試験管様容器であることが好ましい。このような管の容量は、約10ml未満が好ましいが、適切な容器は、より大きなまたはより小さな容量のサンプル空隙を規定し得ることが考慮されている。

20

#### 【0024】

容器20は、典型的な試験管形状を有するように描かれているが、種々の形状を有する代替の容器が考慮されている。したがって、好適な容器は、実質的に赤血球除去部分の回収を促進するために狭くした先端部分を有し得る。代替の容器はまた、V字型底または平底などの種々の形状底を有し得る。さらに他の例において、個々の容器は、複数ウェルのマイクロタイタプレートにおけるようなアレイ部分として形成し得る。好適な容器のさらなる例としては、中空繊維、毛細管アレイ、ビーカー、ポーチ、皿およびシリンダが挙げられる。一般に、密封壁内に液体を保持でき、少なくとも1つが開放できる任意の装置が挙げられる。適切な容器は、ガラスまたはプラスチック上にエッチングされたマイクロチャンネルを有する顕微鏡用スライド、または簡単なプラスチックフォイルもしくはフィルムなどの「開放壁」構造を含むこともさらに考慮されている。

30

#### 【0025】

本明細書の教示に関連して使用される容器は、複数の密封壁内にサンプルを保持し、密封壁の少なくとも1つが可撓性であることが、特に考慮されている。本明細書に用いられる用語の「可撓性」密封壁とは、密封壁を破損または損傷することなく中等度の圧(すなわち、0.5psi未満)を使用して実質的に変形できる壁を称す。例えば、プラスチックフォイルまたは薄いラテックスシートが可撓性であると考えられる。対照的に、ポリカーボネートプレートは典型的に、破損することなく実質的に変形できないことから、典型的な薄い(2mm)ポリカーボネートプレートは、この定義の範囲下で可撓性とは考えられないであろう。したがって、特に考慮された容器は、個々のコンパートメントを有する少なくとも1つの他の密封可撓性壁が取り付けられる(例えば、溶封による薄いプラスチックシート)比較的硬質の1つの壁を有することができ、さらにとりわけ考慮された容器においては、全ての密封壁が可撓性であり得る。このような容器は、エンベロープ形状を有し得、考慮された容器の例は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,300,138号として発行されている米国特許出願第09/272,234号に記載されている。

40

#### 【0026】

容器類は、ガラス、合成ポリマー類、セラミック類、金属類、またはこれらの混合物を含む任意の好適な材料から作製できることが考慮されている。このような容器は、着色または透明、半透明または非半透明であり得、目盛りまたは他の標識を有していても、また

50

は有していなくてもよい。

#### 【0027】

図1Aにおいて、分離されるサンプルは、全血である。このような血液は、一般に新鮮なヒト全血であることが考慮されており、その数ミリリットルを、静脈穿刺により得ることが好ましい。他の例としては、ランセットの使用により10 $\mu$ Lから数百 $\mu$ Lの範囲の容量で得ることができる毛細管血である。さらに、数マイクロリットルから数ミリリットル以上のサンプル容量は、特に比較的多数の細胞を所望する場合に使用できることが考慮されている。例えば、癌患者において照射後の輸血における使用のためにリンパ球が分離される場合、好適なサンプル容量は、実質的に数ミリリットル以上であり得る。同様に、臓器再生用に幹細胞を分離する場合、サンプル容量は、恐らく50ml以上となろう。したがって、考慮される容量は、典型的には1~10mLの範囲、より典型的には10~100mLの範囲、最も典型的には100~500mLの範囲（およびさらにそれ以上）である。

10

#### 【0028】

血液は、添加物の添加、または成分の除去によるなどして前処理できる。考慮された添加剤としては、緩衝剤、水または等張液、抗凝血剤、抗体、および試験液が挙げられる。除去できる考慮された物質または成分としては、抗体、グロブリン、アルブミン、および血小板、白血球細胞などの細胞フラクションが挙げられる。

#### 【0029】

血液は、脊椎動物または無脊椎動物を含む非ヒト供給源からも由来し得る。本明細書に記載の使用血液はまた、任意のタイプの保存から取ることができ、このようなものとしては、冷却血液、凍結血液、または保存剤を有する血液であり得る。

20

#### 【0030】

好ましい実施形態において、第一次抗体42はヒト赤血球細胞に対するマウス誘導モノクローナル抗体であり、本分野においてhRBCに対するモノクローナルAbとしばしば称される。第二次抗体44は、ヒツジ、ロバ、ヤギ、またはマウス誘導抗マウスIgG抗体であることが好ましい。

#### 【0031】

抗体を上昇させる方法は、よく知られている。例えば、第一次抗体および第二次抗体の双方は、ヤギ、ヒツジ、ウマまたは組換え源など、任意の適切な供給源から誘導できる。好適な抗体はまた、IgGおよびIgM、ならびにサブクラスなど、多くのクラスおよびサブクラスから選択できる。さらに、抗体は、Fabまたは(Fab)<sub>2</sub>、またはキメラ抗体などの蛋白分解断片または工学断片を含む多数の分子種から選択できる。抗体の組合せは、特に考慮されている。

30

#### 【0032】

もちろん、第一次抗体および第二次抗体の双方は、これらそれぞれの標的に実質的な結合能を有することが有利であると考えられる。第一次抗体は、赤血球細胞に実質的な結合能を有すること、特に、赤血球細胞の表面に存在する少なくとも1つのリガンドまたは成分に実質的な結合能を有することが好ましいと考えられる。第二次抗体は、好ましくは第一次抗体の少なくとも何らかの成分に実質的な結合能を有することが好ましいと考えられる。

40

#### 【0033】

第二次抗体44は、コーティングされた粒子40のコーティング中に含まれることが好ましい。このような粒子は、磁力により誘引することができ、好ましくは、合成ポリマー類またはセルロースに埋め込まれた常磁性組成物を含むことが好ましい。常磁性粒子が好ましいが、コーティング粒子でもよく、あるいは強磁性物質またはクロム材料またはそれらの混合物を含むことができる。さらなる変法において、好適な粒子を、天然または合成ポリマー類、アガロースなどを含む多くの他の材料でコーティングできる。好ましい粒径は、0.1~100 $\mu$ mの範囲であるが、10~100nmの間または100 $\mu$ m超の代わりの粒径もまた考慮されている。他の態様から見ると、約5x10<sup>-24</sup>m<sup>3</sup>と約5x

50

$10^{-6} \text{ m}^3$  との間の平均容量を有する粒子を使用することが考慮されている。赤血球細胞を標的とする場合、赤血球細胞の直径は、コーティングされた粒子の約 5 倍であることが有利となり得る。

#### 【0034】

用語の「コーティングされた」とは、任意の曝露面の完全または部分的被覆を意味するために本明細書で用いられる。図 1 において、粒子 40 は、第二次抗体を固定化する材料によりコーティングされる。このような固定化は、一時的であっても永続的であってもよく、共有結合または非共有結合を含むことができる。例えば、非共有結合は、ビーズまたは他の固相と共に抗体を温置することを含み得る。他の例として、固相に対する抗体の共有結合は、抗体のアミノ基と、固相上のアルデヒド、または固相上の活性化カルボキシル基とを反応させて共有結合を生じることなどを含み得る。

10

#### 【0035】

さらに他の実施形態において、第一次抗体および第二次抗体の一方または双方を、所望の結合および少なくとも最少限許容できる特異性を有する代替りの組成物で置換またはコンプリメント (complemented) できる。抗リガンド類は、このような代替りの組成物の一般的なクラスであり、適切なリガンドに対して非共有的に結合する任意の分子として本明細書に定義される。抗リガンド類およびリガンド類の例としては、限定はしないが、それぞれ抗体および抗原、ならびに核酸中のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド類が挙げられる。他のポリマー類ならびにヌクレオチド類が考慮されている。さらなる例は、リガンドに対する実質的な結合を有するアプタマー類およびレクチン類である。

20

#### 【0036】

用語の「細胞含有ネットワーク」は、個々の細胞を、除去細胞を溶解することなく機械的に除去することが容易にできない少なくとも 1 つ以上の細胞の凝集物をここでは称す。通常に凝固した血液は、細胞含有ネットワークの一例であるが、疎水的、親水的、静電的、ファンデルワールス、イオン性相互作用などの分子相互作用または他の分子相互作用により媒介された任意の組合せによって実質的に形成された凝集物も考慮されている。したがって、細胞含有ネットワークの他の例は、細胞に実質的な結合を有する抗体または他の結合剤との組合せにより形成された赤血球細胞、白血球細胞または他の細胞の凝集物である。このようなネットワークは、ビーズのような固体支持体を含み得ることが特に考慮されている。

30

#### 【0037】

不均質性の凝集物は、前記第一次抗体が赤血球細胞に結合し、前記第二次抗体が前記第一次抗体に結合する、赤血球細胞と 2 種の異なる抗体との混合物を用いて形成できることが特に考慮されている。抗体の 2 つの結合部分の 1 つだけが、このような結合に関与する場合、以下の凝集物が形成できる：(a) 赤血球細胞に結合した第一次抗体；(b) 前記第一次抗体のみに結合した第二次抗体；および (c) 血液または体液中の赤血球細胞または幾つかの他の細胞タイプに結合している第一次抗体に結合した第二次抗体。抗体の 2 つの結合部分の双方が、結合に関与する場合、凝集物 (a)、(b)、(c) の任意の組合せが形成できることによって、凝集物の潜在的に広大なネットワークを生成する。

40

#### 【0038】

サンプル、抗体または他の抗リガンド類、およびビーズまたは他の粒子は、任意の順序で容器内で組み合わせることができる。例えば、一クラスの実施形態において (示されていない)、容器は、磁氣的に誘引可能なビーズで予め充填されることが考慮される。好適なこのような容器は、Miltenyi Biotec (商標) の MiniMACS (商標) 分離カラムが商品として入手でき、前記カラムは、分離増強装置としても提供される。ビーズを適切な抗リガンドで予めコーティングすることにより、また適切な抗リガンドをサンプルに添加することなどにより、標準的プロトコルを本明細書の教示に合致するように変更する必要があるであろう。

#### 【0039】

50

磁石 50 は、一般にディスク型磁石であるが、代わりの実施形態において、磁石は、異なる形状およびデザインを有することもできる。考慮された代替の磁石としては、棒磁石、U 字形磁石、輪形磁石が挙げられ、クアドラポール、ヘキサポールおよびオクタポールなどを含む任意の好適な複数ポールの幾何学的形状を有することができる。磁石は、永久型磁石、電気磁石、またはさらに超伝導磁石であってもよく、強磁性磁石または希土類磁石であってもよい。さらに、前記磁石は、単一磁石である必要はなく、複数の磁石を含み得ることが有利である。好ましい磁石は、永久磁石に関して 0 テスラから 2 テスラの範囲、電気磁石に関して 0 ~ 100 テスラの範囲の強度を有する。特に好ましい磁石は、磁界強度が 0 テスラから 1 テスラの永久磁石を使用する。

#### 【0040】

本発明の主題のさらなる代わりの態様において、サンプルは、複数の密閉壁内に保持され、分離は、第一および第二の力を使用する複数の密閉壁内で行われる。第一の力は、磁力（上記）を含むが、第二の力は、密閉壁の少なくとも 1 つを介して伝達される自動的機械力を含む。本明細書に用いられる用語の「自動的」機械力は、機械力が、力を手動で適用する以外の様式で適用される方法を称するために本明細書に用いられる。特に考慮される実施形態において、自動的機械力は、可撓性密閉壁に適用される圧力を含む。例えば、全ての密閉壁が可撓性である容器において、磁力は、密閉壁内にネットワークを保持し得るが、機械力（例えば、容器を圧縮する 1 つ以上のアクチュエータ）は、実質的細胞除去部分からネットワーク分離を補助する。

#### 【0041】

図 1 B において、数個のネットワーク 45 は、血液細胞 32（詳細に示されていない）、抗体コーティングの常磁性粒子 40（詳細に示されていない）、および抗赤血球細胞抗体 42（詳細に示されていない）から形成されている。ネットワーク 45 内の粒子 40 は、磁石 50 により誘引されることによって、細胞含有ネットワーク 45 を実質的細胞除去血漿 34 から分離する。

#### 【0042】

赤血球 32 は、一般に成熟非核化赤血球である。これらの血球は通常、サンプル中に存在する赤血球の主形態である。代わりの実施形態において、赤血球はまた、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  または胎児性ヘモグロビンなどの任意のタイプのヘモグロビンを運ぶ赤血球であり得る。赤血球細胞はまた、通常の健常な血球または疾患、例えば、鎌型赤血球貧血症または重症型地中海貧血を引き起している赤血球であり得る。適切な赤血球はまた、多くの発育段階における、例えば、核化赤芽球または加齢の非核化赤血球であり得る。

#### 【0043】

もちろん、本発明の主題は、成熟非核化赤血球に限定されておらず、特に、赤血球発育の他の段階、白血球を含む他の細胞、さらに血小板などの細胞フラグメントも考慮している。したがって、例えば、サンプルが尿を含む場合、臨床家または他の個人は、細菌細胞または管崩れしたブラッダーセルまたは尿道細胞を分離するために本発明の方法および装置を使用でき、この場合、図 1 B の赤血球 32 は、非赤血球で置換できる。

#### 【0044】

あるいは、種々の非赤血球は、特にこのような細胞が、さらなる臨床使用、実験使用、または診断使用のために分離される場合、特に興味深いと云える。特に考慮された代わりの非赤血球の中で、種々の幹細胞、リンパ球および白血球が特に好ましい。本明細書に用いられる用語の「幹細胞」は、細胞系列を引き起す細胞を称し、分裂の際に、1 つは元の幹細胞と置き換わり、他方はさらに分化する異種の娘核を産生する細胞を特徴とし得る。考慮された幹細胞は、未分化幹細胞であることが一般に好ましいが、部分的分化幹細胞も考慮されている。したがって、好適な幹細胞としては、胎児性幹細胞、臍帯血幹細胞、および成人／末端幹細胞が挙げられる。その結果、本明細書に使用のために考慮されるサンプルの供給源は、かなり変化し得、血液、組織サンプル（例えば、皮膚）、商品として利用できる幹細胞および幹細胞系、および胎児性組織を含み得る。考慮された方法により単離された幹細胞は、種々の臨床設定および研究設定に有用となり得ることがさらに考慮さ

れており、特に好ましい使用としては、疾患または壊死臓器または臓器下部構造の少なくとも部分的再生、分化シグナルおよび経路などに対する研究が挙げられる。

【0045】

単離非赤血球が白血球である場合、白血球の全てのサブタイプは、一般に好適であると考慮されており、好中球（多形体）、リンパ球、好酸球、および好塩基球を含む。特に興味深いのは、リンパ球（すなわち、リンパ球系シリーズの幹細胞に由来する血液の白血球）であり、特に種々のB細胞、T細胞、Tヘルパー細胞、およびメモリーB細胞である。このような細胞は、多数の供給源から得ることができるが、最も一般的な供給源は、血液、羊水、骨髄吸引液であることが一般に考慮されている。したがって、白血球またはリンパ球は、任意の適切な供給源（典型的に、サンプルは哺乳動物、より好ましくはヒトから取られる）から得ることができることが考慮されている。

10

【0046】

(i) 所望の細胞タイプに対する特異的な相互作用を形成でき、かつ(ii) 高親和性結合パートナーとの特異的な相互作用を可能にできる、全てのマーカーが、所望の細胞タイプの分離のために一般に使用できることがさらに考慮されている。本明細書に用いられる用語の「高親和性結合パートナー」とは、 $K_d < 10^{-4} \text{ mol}^{-1}$ の親和性を称す。その結果、赤血球マーカー（例えば、グリコホリンA）以外の多数のマーカーが、本明細書の使用に好適であり、分離使用のための種々の幹細胞、白血球およびリンパ球に好適なマーカーを集めた代表例が、下記の表1に提供されている。

【0047】

20

【表 1】

| マーカー             | 同義語                      | 特異性                  |    |
|------------------|--------------------------|----------------------|----|
| 白血球マーカー(一般的)     |                          |                      |    |
| CD 1             |                          | 胸腺細胞、ランゲルハンス組織球      |    |
| CD 33            |                          | 骨髄性前駆体および単球          |    |
| S100             |                          | リンパ節副皮質の嵌合樹状細胞       |    |
| CD 45            | LCA,白血球の一般的抗原            | 全ての白血球               |    |
| CD 30            | Ki-1                     | B、T、および単球のための活性化マーカー | 10 |
| T細胞マーカー          |                          |                      |    |
| CD 2             |                          | T細胞およびNK細胞           |    |
| CD 3             |                          | 全ての胸腺細胞、T細胞およびNK細胞   |    |
| CD 4             |                          | ヘルパーT細胞              |    |
| CD 5             |                          | 全てのT細胞、幾つかB細胞        |    |
| CD 7             |                          | 全てのT細胞、幾つか骨髄細胞       |    |
| CD 8             |                          | 細胞毒性T細胞              |    |
| CD 16            |                          | NK細胞および顆粒球           |    |
| B細胞マーカー          |                          |                      |    |
| CD 10            | CALLA<br>一般的な急性リンパ球白血病抗原 | 早期前駆体およびプレB細胞        | 20 |
| CD 19            |                          | プレB、B細胞であって、血漿細胞ではない |    |
| CD 20            | L26                      | プレBであって、血漿細胞ではない     |    |
| CD 21            | EBV-R                    | 成熟B細胞および濾胞性樹状細胞      |    |
| CD 22            |                          | 成熟B                  |    |
| CD 23            |                          | 活性化骨髄細胞B             |    |
| 他の特異的および一般的なマーカー |                          |                      |    |
| CD 15            | Leu M2                   | 全ての顆粒球、リードースターンバーグ細胞 | 30 |
| CD 34            |                          | 早期多分化能前駆細胞           |    |
| CD 61            | 血小板グリコホリン                | M7AMLと関連             |    |
| EMA              | 上皮マーカー抗原                 | 上皮細胞                 |    |
| TdT              |                          | TおよびBリンパ球、成熟前に喪失     |    |
| 幹細胞マーカー          |                          |                      |    |
| SSEA-3           |                          | 霊長類胚幹細胞              |    |
| SSEA-4           |                          | 霊長類胚幹細胞              |    |
| TRA-1-60         |                          | 霊長類胚幹細胞              |    |
| TRA-1-81         |                          | 霊長類胚幹細胞              | 40 |
| Sca-1/Thy-1.1 lo |                          | 造血幹細胞                |    |
|                  |                          | 造血幹細胞                |    |

## 【0048】

所望の幹細胞、白血球、またはリンパ球に関するマーカーに対する特定の抗体または親和性剤が、商品として入手できない場合、好適な抗体または抗体断片は、当業界によく知られた標準的方法（例えば、William C. Davis; Humana Press; ISBN: 0896033082によるMonoclonal Antibody Protocols (Methods in Molecular Biology, 45)を参照）を用いて増加し得ることが考慮されている。

## 【0049】

高親和性結合パートナー（例えば、抗体または抗体断片）に結合した細胞は、当業界によく知られた種々の技法を用いて、このような結合パートナーから遊離できることをさにより認識される必要があり、特に考慮される遊離法としては、高親和性結合パートナーが、特異的な高温処理、酸性化（例えば、 $\text{pH} < 3.5$ ）、蛋白分解、および緩和なカオトロピック剤である過剰の抗原またはエピトープとの競合が挙げられる。細胞からの高親和性結合パートナーの分離なしに磁気ビーズから除去されることが望ましい場合、高親和性結合パートナーと磁気粒子との間の共有結合を切断する種々の方法が考慮されている。このような方法の中で、ジスルフィド結合の還元的開裂、または磁気粒子に対する高親和性結合パートナーを結合させるリンカーにおける結合の酵素的開裂（例えば、ペプチダーゼを経て）が特に好ましい。抗体からハプテンを除去する代表的な方法は、Pascal Bailon、George K. Ehrlich、Wen-Jian Fung、Wolfgang Berthold、Wolfgang Berthold (Humana Press; ISBN: 0896036944) による Affinity Chromatography: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)、または Toni Kline (Marcel Dekker; ISBN: 0824789393) による Handbook of Affinity Chromatography に記載されている。

10

#### 【0050】

多種多様のサンプルを操作することに加えて、本明細書に記載された本発明の方法および装置は、多種多様の検体を測定するために使用することもまた考慮されている。考慮された検体としては、前立腺特異的抗原 (PSA) などの腫瘍マーカー、感染症マーカー、テストステロン、エストロゲン、プロゲステロンおよび種々のサイトカイン類などの内分泌マーカー、およびクレアチニン、グルコースなどの代謝マーカーが挙げられる。

20

#### 【0051】

図 2A において、血液分離装置 110 は、赤血球 132（詳細に示されていない）、抗赤血球抗体（詳細に示されていない）および抗マウス抗体 144（詳細に示されていない）を含む全血 130 から形成されたネットワーク 145 を含有する軟壁容器または他に可撓性容器 120 を有する。フィルタ 160 は、ネットワーク 145 をろ過し、血漿 134 がコレクションエリアを通過するようにする。

#### 【0052】

フィルタ 160 は、血液の細胞成分のサイズ以下の孔径、または個々の細胞よりも大きな孔径を有するが、ネットワークよりも小さな孔径を有するガラス繊維フィルタであることが好ましい。代わりの実施形態において、フィルタは、クロマトグラフィ用ペーパー、天然繊維または合成繊維、多孔性膜など多くの材料から作製できる。これら代わりのフィルタに関する例は、ナイロン繊維フィルタ、サイズ排除膜、ペーパーフィルタ、不織布フィルタである。さらに、フィルタ類は、例えば、溶血を減少させるために、または選択されたフラクションまたは分子を特異的に維持するために材料でコーティングしても、しなくてもよい。適切なコーティング剤としては、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリカチン性ポリマー類、レクチン類または抗体類が挙げられる。

30

#### 【0053】

図 2A において、サンプルのフィルタ部分は、重力によりフィルタを通過させる。しかしながら、フィルタを通してサンプルを移動させる駆動力は、膜を横切る差力または差圧であってもよく、本明細書の他の箇所に記載された遠心分離、真空、圧縮ガス、または磁石を含む多くの方法で達成できることが認識される。ろ過時間は、大きく変化し得るが、一般に 2、3 秒から 30 分未満の範囲内であると考えられる。もちろん、このような分離特性および効率または、例えば、白血球、リンパ球、および幹細胞など、赤血球以外の種々の細胞から得ることができることを認識する必要がある。

40

#### 【0054】

図 2B は、赤血球 132 に結合している抗赤血球抗体 142、および抗赤血球抗体 142 に結合している抗マウス抗体 144 を含むネットワーク 145 の可能性部分の詳細を示

50

している。当業者は、単一ネットワークが数百万の細胞を含有できることを認識するであろう。また図 2 Bにおける種々の成分の配向性および接続は、単に代表的であり、実際のネットワークにおいて必ずしも見られないであろうことを認識する必要がある。他のものの中で、リアルライフネットワークは、示されている二次元図ではなくて三次元であろうし、抗体は、図面に示されているよりもはるかに小さくなるであろう。図 1 Bのネットワーク 4 5は、図 2 Bに示された構造に対応する構造を有することが考慮されることもまた認識する必要がある。

#### 【0055】

図 3において、血液分離装置 210は、血液サンプル 230を受け入れる容器 220、抗赤血球抗体 264でコーティングされたプレフィルタ 260、および抗赤血球抗体 274でコーティングされた第 2のフィルタ 270を有する。サンプル 230の部分は、部分的細胞除去液体 233を提供するためにプレフィルタ 260を通してろ過し、細胞除去液体 233の部分は、第 2のフィルタ 270を通してろ過して実質的細胞除去液体 234を提供する。

10

#### 【0056】

ここで、容器 220は、容器 20に関して先に記載された容器の範囲内に入る容器であることが考慮されており、血液 230と 30、赤血球 232と 32、第一次抗体 264と 42、第二次抗体 274と 44、および血漿 234と 34に関しても同様の対応が存在する。

#### 【0057】

20

好ましい前記プレフィルタ材料は、ナイロン繊維の非圧縮層を含むナイロンウール 260である。前記第 2のフィルタ 270は、マウス抗赤血球抗体 274が結合しているガラス繊維ディスクが好ましい。代わりの実施形態において、フィルタ 260および 270のいずれかまたは双方を、繊維状フィルタ材料、フィルタペーパー、多孔性膜などを含む任意の他の好適なフィルタ材料で置き換えることができる。ここでの例としては、コーティングまたは非コーティングガラス繊維、鈹物ウール、クロマトグラフィ用ペーパーなどが挙げられる。さらに、フィルタ材料は、例えば、溶血を減少させるために、または選択されたフラクションまたは分子を特異的に維持するためにコーティングしても、しなくてもよい。適切なコーティング剤としては、先に述べた以外にポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリカチオン性ポリマー類、レクチン類または抗体類が挙げられる。

30

#### 【0058】

図 4において、代わりの特に好ましい代表的使い捨て診断用容器 10の平面図が示されており、一般に、サンプル導入ポート 12を有するポーチ、複数のコンパートメント 13、22、26、28、30、および 32、ならびに導入口 12とコンパートメント 13とを連結する通路 16、および種々のコンパートメントを相互連結する入口 24、34、36、38および 40を含む。

#### 【0059】

容器 10は、コンパートメント、導入ポート、通路および入口が、溶封により全て規定されている約 8.5 cm 掛ける約 19 cmで、約 1 ミリメートルの厚さの測定値を示す、比較的平坦な層状プラスチックポーチである。容器の性質および寸法、コンパートメントおよび相互接続の配列、ならびにコンパートメントの容積は、もちろん、実施形態毎に変わり、当業者は、図 4の実施形態が、このように可能な膨大な数の容器の単に代表的なものであることを認識するであろう。

40

#### 【0060】

容器のサイズは、例えば、含有される反応物の容量に大いに依存するが、実際の容器は、50 マイクロリットルと約 5 ミリリットルとの間の範囲の容量を規定する寸法に合わせて作製されることが考慮されている。好適な容器は、その形状が、容器の少なくとも一方の側が複数のアクチュエータと接触させることを可能にする限り、多種の形状を有し得る。好ましい形状は、平坦なエンベロープ様形状であるが、箱型様、円形、半球形、またはさらに球形もまた考慮されている。

50

## 【0061】

容器10を形成する対向の上部および下部のシートは、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリエチレン、塩化ポリビニル、塩化ポリビニル、およびポリウレタンなど、熱可塑性材料から形成されることが有利であり得る。このようなシートは、約0.05mmから約2mmの間の比較的均一な厚さを有するように考慮されている。前記対向シートは、同じ材料から製作する必要はない。例えば、1枚のシートが、反射フォイルを含み得、他のシートが、透明または半透明プラスチックを含み得る。フォイルの使用は、温度安定性の促進を助け、さらに湿気および酸素バリアとして寄与できる。フォイルはまた、熱源からサンプルまたは試薬への熱移動を増強できる。

## 【0062】

好ましい容器は、全体的または部分的に可撓性である。本明細書で特徴とする可撓性は、構造または材料を損傷することなく形状を一時的に変化させることにより妥当な力を生じさせる能力である。本明細書に用いられる妥当な力は、典型的には5lb/インチ<sup>2</sup>以下の圧力である。例えば、好ましい平坦なエンベロープ様容器は、容器を破損または引き裂くことなく1インチ直径の円柱状の対象の周囲を包み込むのに十分可撓性である。他の例において、容器部分は、外壁を破裂させることなく、その部分内に運ばれた容量を置き換える上で十分に可撓性であることが有利であり得る。さらに、前記容器を製作し得る上部および/または下部のシートの少なくとも一部が、透明または半透明であることが考慮されている。前記容器は、複数の開口部をさらに有する。開口部の数は、少なくとも1つの開口部と20以上の開口部との間でかなり変化し得る。このような開口部は、密封できるような閉鎖機構を有するか、密封可能であるかまたは永続的に開いている。さらに、幾つかの開口部は、互いに液体連通し得るか、または通気口もしくはオーバーフロー口として使用できる。さらに前記容器は、複数のコンパートメントを有することを特徴とする。

## 【0063】

容器10はまた、アナライザ400に整列支柱を取り付けるための取り付けホール42を含む。代わりの取り付け用具または方法も、適切な位置で容器10に接続されたフック、ループおよび他の取り付け付属品を含んで考慮されている。容器10は、構成材料の取り付けがないこともあり得ることがさらに考慮されている。

## 【0064】

また、1つ以上のラベル（示されていない）も容器10に付着させ得る。ラベルは、確認マーク、実施される診断試験のタイプに関連する情報、ならびに患者情報、試験結果データ、または他の情報を示すことができる。ラベル（単数または複数）は、場合によっては取り外すことができ、例えば、患者の医療ファイルに据え付けるために容器10から取り外すことができることによって、誤りの可能性を伴ってデータを転写する必要が除かれる。

## 【0065】

導入ポート12は、サンプルまたは他の物質を受け入れる入口点として役立つ。多くの形態が考慮されているが、前記入口点は、ある種の共通接続機構を使用することが好ましい。例えば、図4の入口点12は、Luerロック機構のメス部分である。代わりの入口ポートは、より簡単であっても、より複雑であってもよく、針を用いて穿刺するか、または貫通させることのできる詰め物を含むことができる。また、考慮された入口点は図4に示された以外の容器上のどこかに設置することができる。例えば、固体材料に好適な入口点は、容器の上部または下部を形成するシートの1枚に簡単なスロットとして形成し得る。このような入口点は、組織または無機質サンプルなどの比較的硬い部片を受け入れるために十分に都合がよく、フラップ機構またはテープ機構により密封し得る。

## 【0066】

コンパートメント13、22、26、28、30、および32は、少なくともある時間の間、容器の他の部分から流体として分離される容器10の部分である。一般に、コンパートメントは、容器壁の少なくとも1つと接触する少なくとも1つの連続構成要素を用いて互いに分離されている。例えば、容器がシリンダである場合、連続構成要素は、シリン

ダの縦軸に多かれ少なかれ直交し、シリンダの内周に接触するデバイダであり得る。容器が平坦なバッグである場合、前記連続構成要素は、規定空間を取り囲む形態で対向側間での溶封を含むことが有利であり得る。

#### 【0067】

好ましいコンパートメントの容量は、容器の全容量の約3%から凡そ90%との間で変わることが有利であり得る。このようなコンパートメントは、サンプル、試薬、または空気で満たされ得るが、前記コンパートメントはまた、本質的に空隙容量を有さないこともあり得る。例の目的で、コンパートメント22は、約1mlの結合反応物を含有するようにデザインでき、洗浄コンパートメント28は、約5mlまでの溶媒溶液を保持するようにデザインできる。

10

#### 【0068】

少なくともコンパートメントの幾つかは、シグナルが検出できるか、または反応の進行が、モニターできる透明部分を含むことが有利であり得る。このような場合、シグナル検出を改善するために、対向面が反射面を示すこともまた有利であり得る。コンパートメントはまた、例えば、熱、光、または他の照射に対して遮蔽できる。検出できる特に好ましいシグナルとしては、発光および／または蛍光マーカー、および散乱光（例えば、細胞または細胞デブリによる散乱光）からのシグナルが挙げられる。

#### 【0069】

通路16ならびに入口34、36、38、および40は、種々のコンパートメントおよび容器内の他の空間、ならびに外部環境に流体として接続するために役立つ。用語の「流体として接続する」とは、液体、ガス、または流体性固体であろうと、任意の流体組成物の移動を特に含む。多くの場合、流体は、単一方向にのみ移動するように意図されるが、他の場合、前方と逆方向の双方に少なくとも一部の流体を移動させることが有利であり得る。幾つかの場合において、コンパートメントまたは他の空間は、ある時間バリエーションにより分離でき、前記バリエーションは、ある時点で突破されることが考慮されている。このような場合において、分離コンパートメントまたは他の空間は、「流体として接続可能」であるように考慮されている。

20

#### 【0070】

図4による容器が使用される場合、このような容器は、図5に図式的に示された自動化アナライザと協働することが特に好ましい。ここで、アナライザ400は一般に、容器アクチュエータ組立て品412、ドア420、検出器440、散乱ユニット450、およびインターフェース460を有するハウジング410を含む。アナライザ400は、代表的なワークピース容器200を有して示されている。ハウジング410は、考慮された試験を完了するために必要とされる本質的に全ての電子回路部品または他の回路部品を収納する。もちろん、ハウジング410は、任意の好適な形状および寸法を用いてデザインでき、プラスチック、金属、または任意の他の好適な材料から形成できる。アクチュエータ組立て品412を有する容器受入れゾーンは、考慮された試験中に容器10を受け入れるためにドア420と協働する。代替の実施形態において、ドアは全く必要とされず、その代替りとして容器を、アクセススロットに挿入できる。整列支柱414は、任意の好適な様式で構成でき、また全部除くことができる。

30

40

#### 【0071】

アクチュエータ組立て品412は、容器10によりある物質に影響を与える目的で、容器10に1つ以上の力を送達するために使用される。412群の部分形成し得るアクチュエータの例は、圧縮パッド、ロールバー、またはホイールである。考慮されたアクチュエータはまた、加熱、冷却、照射、および磁力の送達などの1つ以上のさらなる機能を有し得る。例えば、アクチュエータは、酵素を熱的に不活化するか、または反応物を所望の温度に加温できる。他の例において、アクチュエータは、磁気ビーズの表面に結合させることにより検体を濃縮するために使用できる。アクチュエータはまた、流体、固体、または空気により占められた容量を変更するために使用できる。前記流体としては、例えば、緩衝液、サンプル、反応混合物、試薬溶液などを挙げることができる。前記固体としては

50

、常磁性ビーズを挙げることができ、前記ガスとしては、保護剤として窒素もしくはアルゴン、または化学反応の副産物として $\text{CO}_2$ を挙げるができる。

【0072】

アクチュエータが圧縮パッドを含む場合、適切な様式で容器の一部に適切な力を働かせるのに好適な任意の材料から作製できる。典型的に、圧縮パッドは、実質的に平面であり、コンパートメントまたは通路の形状に対応する形状を有する。アクチュエータを、他に仕切りを密封するために使用する場合、仕切りエッジは、好ましくはウェッジまたは突起を有する圧縮パッドの形体で提供できる。

【0073】

さらに、本発明の主題の代わりの態様において、アクチュエータ群は、光源および／または光検出器（検体シグナルを検出する検出器以外の検出器が好ましいが、必要ではない）を含む1台のアクチュエータ（圧縮パッド、加熱パッドとして働くか、または他の機能を供することができる）を含み得る。例えば、前記アクチュエータは、レーザダイオード（例えば、約632nmの波長を有する）を含むことができ、検出器が、レーザダイオードにより放射され、細胞含有サンプル中の細胞から散乱されるレーザダイオードによって放射される光を検出できるようにレーザダイオードから間隔をおいて配置されているフォトセルを含むことが考慮されている。

10

【0074】

もちろん、光源および／または光検出器の位置は、圧縮パッドに限定される必要はなく、より好ましい態様において、光源および／または光検出器は、圧縮パッドとは別に、または平坦な容器の反対側に配置でき、さらにより好ましい態様において、光源および／または光検出器の少なくとも1台は、アクチュエータ群に対して反対側（すなわち、容器に接触し、アクチュエータ群を含まない装置側面またはその部分（例えば、ドア、またはシグナル検出器に隣接した））の分析装置内に位置することを認識する必要がある。例えば、装置が、同じ側（容器に関して）に光源と光検出器を含む場合、光源と光検出器との間の距離は、好ましくは、約1mmと10mmとの間であり、最も典型的には、約3.5mmである。あるいは、光検出器の機能はまた、検体シグナルの検出に使用される光電子増倍管により提供でき、したがって、光源と光電子増倍管との間の距離は変わり得る（例えば、典型的に1mmと10mmとの間）。

20

【0075】

さらに、光ガイドの一端が、細胞含有サンプルと光通信し、光ガイドの他端が、光源または光検出器と光通信するように、前記光源および／または前記光検出器は、光ガイド（例えば、光ファイバケーブル、または他の光伝送構造）で置き換え得ることを認識する必要がある。2本の光ガイドと代表的なアナライザの代表的な詳細図は、図6に示されており、アナライザ600（部分のみが詳細図に示されている）は、第1の光ガイド620（光源に光学的接続）および第2の光ガイド630（フォトセルに光学的接続）を含む散乱ユニット610を有する。散乱ユニット610は、光電子増倍管を収納する空隙に近位である。

30

【0076】

なおさらなる代わりの態様において、光源および波長は、かなり変わり得ることが考慮されている。例えば、好適な光源としては、多数の単色光源および多色光源が挙げられ、白熱光、蛍光、およびレーザ光を提供できる。さらに特定の波長を所望する場合、1枚以上のフィルタを、光源および／または光検出器に光学的に接続できる。なおさらなる代わりの態様において、光検出器の性質は、かなり変わり、検出器440に関して下記と同じ考慮が適用され得る。さらに、発明者らは、前記光検出器は、図5の検出器440により置き換え得ることも考慮している。

40

【0077】

検出器440は、容器の使用により発生したシグナルを検出するために用いられる本質的に1台または任意の組合せのシグナル検出器である。考慮されたシグナル検出器としては、光電子増倍管、フォトダイオード、および電荷結合素子が挙げられる。場合によって

50

は、アナライザ400に検出器440を含む。ペーパーラベルまたはシートにプリントすることを含む、人または機械読取り可能なフォーマットの任意の組合せにおいて情報をプリントするために、場合によっては、プリンタ450を使用する。場合によっては、アナライザ400にプリンタを含む。インターフェース460は、他の装置との情報を交換する任意のタイプの電子手段または他の手段であり得る。典型的なインターフェースは、一般的なRS232（直列式）データポートである。バーコードを検出できるスキャナ、またはラベル上に含まれる他の手書きまたは機械書き情報を含む、アナライザ400に関する他のオプションは示していない。

#### 【0078】

光源により放射された光波長に依存して、ヘマトクリット値を決定するために光散乱以外の多数の測定機能が使用され得ることを認識すべきである。例えば、（ヘマトクリット値が決定され、細胞溶解剤が血液サンプルに加えられた後）、ヘモグロビン、および／またはオキシヘモグロビンが、適切な波長を用いてサンプル容器中で分光光度的に決定することが特に好ましい。ヘモグロビン含量を決定するために当業界に知られた多数の方法があり、知られた方法の全ては、本明細書の使用に好適であると考えられる。参照により本明細書に組み込まれる、例えば、Bullらは、「Reference and Selected Procedure for the Quantitative Determination of Hemoglobin in Blood; Approved Standard」（ISBN 1-56238-425-2）に標準的測光法が記載されている。

#### 【0079】

第1の分析のために光源および光検出器（または光電子増倍管）ならびに同じサンプルの第2の分析のために光電子増倍管を用いる分析法の組合せは、第2の分析結果の標準化が望ましいか、または不可欠である場合に特に有利になり得ることを特に認識すべきである。例えば、グリコシリ化ヘモグロビンは、全ヘモグロビン上のグリコシリ化ヘモグロビンのフラクションとして測定されることが多い。したがって、考慮された分析装置における全ヘモグロビンの決定は、光源および散乱ユニットの光検出器を用いて分光光度的試験において実施できるが、一方、グリコシリ化ヘモグロビンの決定は、光電子増倍管を用いて免疫アッセイにおいて実施される。もちろん、第1および第2試験の特定の性質は、全ヘモグロビンおよびグリコシリ化ヘモグロビンに限定されていないことを認識すべきである。実際、異なる波長を有する2つのシグナルおよび異なる起源のシグナル検出を必要とする知られた試験は全て、本明細書の使用に好適であると考えられている。例えば、第1のシグナルとしては、吸収、反射、および／または散乱シグナルが挙げることができ、一方、第2のシグナルは、生物発光シグナル、化学発光シグナル、蛍光シグナル、および／またはりん光シグナルであり得る。

#### 【0080】

前記アナライザは、圧縮パッドおよび仕切りエッジが、診断試験時の特定の時間に特定の外力を適用するようにプログラム化できる。さらに、アナライザ装置は、装置内の容器の正しい位置付けのために配列手段（例えば、複数のピン）を有することができる。さらに、前記アナライザは、各圧縮パッドおよび仕切りエッジのいずれかの側に圧力センサを有することができる。これらのセンサを使用して、適用する圧力量を決定し、調節することができる。さらに、これらのセンサは、各圧縮パッドおよび仕切りエッジが、操作時に正しく働いているかどうかを決定するために使用できる。同様に、前記光源および光検出器は、サンプル、特に細胞含有サンプルのオペレータおよび／またはソフトウェアの光散乱情報を提供するために種々の回数で操作できる。

#### 【0081】

一般に、サンプルを、圧力下、入口ポート12に配置し、サンプルコンパートメント13に移動させる。コンパートメント13の容積超の過剰のサンプルは、コンパートメント13内でサンプル量を一定分割するために役立つ流出用コンパートメント20内に流出する。サンプルが、細胞含有流体（例えば、場合によっては1種以上の試薬と混合されてい

るストレートまたは希釈された全血、)を含む場合、光源により光(好ましくは、620 nmと660 nmとの間の最大波長を有する光により)をサンプルに放射することにより、散乱光が生じ、次いで光検出器により検出されることが特に好ましい。

#### 【0082】

通常の当業者は容易に認識するであろうが、細胞含有サンプルにおいてそのように創製された散乱光の強度は、細胞含有サンプル中のヘマトクリット量に依存する。本明細書に用いられる用語の「ヘマトクリット」とは、血液サンプル中の細胞および細胞デブリスの全体を称し、したがって、赤血球、白血球、血小板などを含む。細胞含有サンプル中、特に血液中のヘマトクリット値を算出するために当業界に知られている多くの方法があり、このような決定に関して代表的な引用文献としては、米国特許第6,419,822号および米国特許第6,064,474号が挙げられ、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0083】

コンパートメント22の第1の反応物をサンプルに加え、適切な温置後、このサンプルを反応コンパートメント26にバイパスする。反応チャンバ26は、追加の反応物を含有でき、なおさらなる反応物を基体または他の反応コンパートメント30から加えることができる。加工段階の1つ以上の時点で、サンプルを、洗浄コンパートメント28の洗浄液により洗浄できる。廃棄材料は、廃棄コンパートメント32に押し込められる。これらの工程中、種々の反応が、サンプル内の検体に関して行われ、検体量または検体の存在に対応する着色または他の検出可能なシグナルを生じる。前記シグナルは、コンパートメント26の側壁の1つを介して「読取り」がなされる。

#### 【0084】

所望の場合、読取りシグナルを、次に測定散乱光と共に計算し、ヘマトクリットが予め除かれているサンプルの値に対応する値に対して読取りシグナルを標準化する。したがって、考慮された形態および方法を用いて、検体は、サンプルから細胞を除くことなく、細胞含有サンプル(好ましくは、全血)中で検出できることを特に認識すべきである。

#### 実験

血漿から赤血球を分離する試験が実施され、その結果は以下に記載されている。さらなる試験が、流体から細胞成分を予め除去することなく、細胞含有流体における種々の抗原の濃度を決定するために実施された。これらの試験は、上記の幾つかの原理を説明するためにのみ意図されており、請求された主題の範囲に対する限定として解釈される意図はない。

#### 【0085】

##### 実験セット1

第1のシリーズの実験において、赤血球の沈殿が、マウス抗赤血球抗体、ヤギ抗マウス抗体でコーティングされた常磁性ビーズおよび0.5 mlの抗凝血化全血を用いて実施された。ヘパリン化EDTAまたはクエン酸化全血は、10  $\mu$  lの非希釈マウス抗赤血球抗体溶液(Red Out(商標); Robbins Scientific社)と2分間混合し;次に、ヤギ抗マウス抗体でコーティングされた常磁性ビーズ(Cortex Biochem社、MagaCell(商標)またはMagaBeads(商標); 30 mg/mL;またはPierce MagnaBind(商標))を含有する10  $\mu$  lの溶液(等張性PBS、pH 7.4)を加え、2分間緩やかに混合した。チューブの底を磁石(永久鉄磁石;凡そ0.2テスラ)上に置いた。直ぐに細胞ネットワークの沈殿が開始し、約2分後に実質的に終了した。血漿を容器の上部から吸引により採取した。

#### 【0086】

意義深いことに、ここに記載された方法と装置は、比較的短時間でネットワークから理論的に獲得可能な細胞除去部分の少なくとも70%(容量で)を分離することが判明した。多くの場合、このような90%分離に要する時間は、30分未満であり、他の場合においては10分未満であり、さらに他の場合においては2分未満である。30分未満内でネットワークから理論的に獲得可能な細胞除去部分の少なくとも80%、少なくとも90%

、少なくとも95%、および少なくとも98%を達成する分離もまた、ここで記載された方法を用いて実施された。

#### 【0087】

このような分離特性および分離効率はまた、赤血球以外の種々の細胞を用いて得られことができ、特に考慮された代わりの細胞としては、種々の幹細胞、リンパ球、および白血球が挙げられることを特に認識すべきである。

#### 【0088】

##### 実験セット2

第2のシリーズの実験において、顕微鏡スライド上の赤血球の沈殿は、全血、マウス抗赤血球抗体およびヤギ抗マウス抗体でコーティングされた常磁性ビーズを用いて実施された。0.2mlの新鮮全血に、5:1の抗赤血球抗体含有溶液 (Red Out (商標)) を加え、混合し、室温で2分間温置した。次に、ヤギ抗マウス抗体 (MagaCell (商標)) またはMagaBeads (商標) またはMagaBind (商標) でコーティングされた常磁性ビーズを含有する5:Lの溶液を加え、混合し、さらに2分後、2つのディスク型磁石を、スライドの反対端に置いた。約1.5分後、ゾーンを含有する透明な血漿が、2つの磁石の間で形成され、これを、側方固定された細胞含有ネットワークを乱すことなくピペットにより回収した。

10

#### 【0089】

##### 実験セット3

4つの側のうち3つがシールされた平坦なエンベロープを、透明なアセテートシート (例えば、the 3M社製品、3MCG3460)、またはプラスチックシートプロテクタ (例えば、Avery-Dennison PV119E)、または小型「ZipLock」またはITW社のMiniGrip (商標) バッグ (2.5X3cm; 2.0ミル) から製造した。0.5mlから1mlの抗凝血化全血をバッグに注入し; 10μLのRed Out (商標) (上記参照) を添加し、容器を緩やかに振ることにより血液と混合した。2分後、抗マウスコーティング磁気ビーズ (MagaCell (商標)) を加え、混合し、バッグの開放側をシールした。2分後、バッグを角型永久鉄磁石 (凡そ0.2テスラ) 上に水平に置いた。細胞が付着しネットワーク化された磁気粒子を、磁石に隣接するように動かし、上澄液として血漿の透明層が残った。次にバッグを、磁石上に置いたまま直立位置に回転し、開封してピペットを用いて血漿を吸引した。エンベロープまたはバッグ (抗RBC抗体で予め処理した血液および抗マウスコーティング常磁性ビーズ) は、狭い距離で分離した2つの永久磁石間を通過できることも発見された。袋が、磁石間の上方に引っ張られたので、細胞ネットワークは、容器の底に引っ張られ、上層に血漿が生じる。

20

30

#### 【0090】

したがって、この例において、容器は、複数の可撓性密封壁内にサンプルを保持し、サンプル内に形成された細胞含有ネットワークは、複数の密封壁内で分離される。あるいは、エンベロープまたはバッグを、2つの磁石間を通す代わりに、容器に比して細胞ネットワークを移動させるために、アクチュエータまたは他の機械装置を利用してバッグの圧縮を使用できた。この場合、第2の力 (すなわち、自動的機械力) は、実質的に細胞除去部分からネットワークを分離するために使用され、前記第2の力は、密封壁の少なくとも1つを通して伝達される。

40

#### 【0091】

##### 実験セット4

一実験において、少量のスチールウール (PBS中、5mg/mL BSAで12時間洗浄し、処理された) を、サンプル容器に加えてから、血液および沈殿剤を加えた。Red Out (商標) およびMagaCell (商標) 剤の添加後 (各々2分間)、チューブを磁石上に置いた。細胞ネットワーク内に含んだ常磁性ビーズをスチールウールに固定させた。ピペットチップは、血液細胞が本質的に遊離した血漿の吸引用に使われた。蛋白質または幾つかの他のポリマーでコーティングされた場合、前記スチールウールは、2時

50

間内で細胞ペレットにおける溶血現象を殆ど引き起さなかった。デキストラン、ポリエチレングリコール上のポリビニルピリドンなどの他の非溶血性ポリマー類でコーティングされる場合、鉄ワイヤ、ウール、またはビーズが上記のように添加できることがさらに考慮されている。

#### 【0092】

他の実施形態において、15の鉄無頭釘を、12mmガラスチューブの外部底の1/3の周囲にテープで貼り、その中で全血を、マウス抗赤血球細胞抗体およびヤギ抗マウス抗体でコーティングされた常磁性ビーズと共に上記のように温置した。角型磁石上にチューブを置くと、殆ど直ちにチューブの底部および側壁に沈殿を生じた。前記外部無頭釘により磁気源をサンプルチューブのより近くに置かれ、したがって、比較的均一な二次的側方誘引源がサンプルカラム全体に適用され、細胞ネットワークが、チューブの側壁に移動するにつれ、さらに凝集する。

#### 【0093】

##### 実験セット5

本明細書に記載された方法および装置により生じた試験結果は、表1に示されている。これに関して、遠心分離は、全血から細胞物質を除去する上で少なくとも99%有効であり（99%分離効率）、本明細書に記載された方法および装置（表中に「装置」と記載）は、殆ど有効であることに注意すべきである。特に、本明細書に記載された方法および装置は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%の分離効率を有するとして記載できる。

#### 【0094】

##### 【表2】

表1

| 対象 | 血漿容量<br>mL |      | PSA<br>Ng/mL |      | テストステロン<br>ng/mL |       | クレアチニン<br>mg/dL |      |
|----|------------|------|--------------|------|------------------|-------|-----------------|------|
|    | 遠心分離       | 装置   | 遠心分離         | 装置   | 遠心分離             | 装置    | 遠心分離            | 装置   |
| 1  | 0.45       | 0.36 | 28.5         | 27.2 | 4.78             | 5.45  | 0.75            | 0.64 |
| 2  | 0.55       | 0.48 | 25.1         | 23.2 | 14.45            | 11.2  | 0.70            | 0.62 |
| 3  | 0.53       | 0.48 | 27.2         | 26.4 | 16.19            | 15.18 | 1.04            | 1.06 |
| 4  | 0.48       | 0.40 | 26.9         | 24.8 | 11.18            | 10.96 | 0.97            | 0.91 |
| 5  | 0.57       | 0.51 | 25.9         | 24.2 |                  |       | 0.84            | 0.91 |
| 6  |            |      | 21.3         | 20.2 | 10.97            | 10.15 | 1.11            | 1.10 |
| 7  |            |      | 25.2         | 23.6 | 6.08             | 7.58  | 0.69            | 0.72 |
| 8  |            |      | 25.5         | 20.4 | 18.06            | 22.79 | 0.99            | 0.91 |
| 9  |            |      | 16.4         | 16.6 | 0.46             | 0.27  | 1.35            | 1.49 |

| 対象 | ヘモグロビン<br>g/dL |      | 血漿<br>ヘマトクリット<br>% |      | 赤血球<br>数百万/uL |      | 白血球<br>数千/uL |     |
|----|----------------|------|--------------------|------|---------------|------|--------------|-----|
|    | 遠心分離           | 装置   | 遠心分離               | 装置   | 遠心分離          | 装置   | 遠心分離         | 装置  |
| 1  | 0.27           | 0.16 |                    |      |               |      |              |     |
| 2  | 0.27           | 0.19 |                    |      |               |      |              |     |
| 3  | 0.38           | 0.24 |                    |      |               |      |              |     |
| 4  | 0.25           | 0.15 |                    |      |               |      |              |     |
| 5  | 0.48           | 0.13 |                    |      |               |      |              |     |
| 6  | 0.12           | 0.05 | <0.1               | <0.1 | 0             | 0    | 0.2          | 0.1 |
| 7  | 0.16           | 0.08 | <0.1               | <0.1 | 0             | 0    | 0.2          | 0.2 |
| 8  | 0.22           | 0.09 | <0.1               | <0.1 | 0             | 0.02 | 0.2          | 0.2 |
| 9  | 0.33           | 0.17 | <0.1               | <0.1 | 0             | 0    | 0.2          | 0.2 |

#### 【0095】

##### 実験セット6

図5に示されたアナライザが、ヘマトクリット濃度に依る全血の反射測定に使用された

。この特定の実験において、アナライザ400は、ハウジング410およびアクチュエータ組立て部品412を有した。保持用ピン414は、アクチュエータ組立て部品412、光電子増倍管442、および散乱ユニット450に関して予め決められた位置に容器200（図4もまた参照）を保持した。散乱ユニット450は、光ファイバを保持した第1の光ファイバポート452を含み、前記ファイバの一端は、容器（1つの側が透明である）に接触し、容器内に配置された全血を照射し、一方、前記光ファイバの他端は、最大波長632nmを有するレーザダイオードにより照射されるように、前記ファイバをファイバポート452に固定した。

#### 【0096】

散乱ユニット450は、他の光ファイバを保持した第2の光ファイバポート454を含み、前記ファイバの一端は、容器（1つの側が透明である）に接触し、全血中の細胞による散乱光を受け、一方、前記光ファイバの他端は、フォトダイオードに光学的に接続されるように、前記ファイバをファイバポート454に固定した。フォトダイオードのシグナルは、電子的に増幅され、当業界によく知られた標準的な機器を用いて記録された。

#### 【0097】

このような構造において、ヘマトクリット濃度と反射率との間の相関を決定するために、知られたヘマトクリット濃度を有する全血サンプルを個々に容器に入れ、この容器をアナライザに配置して照射した。本実験結果は図7Aに示され、反射率は、高い相関係数でヘマトクリット値と線形関数であることが判明した。

#### 【0098】

##### 実験セット7

先の実験のアナライザを用いて、知られたヘマトクリット濃度を有する全血サンプルを、2つの部分に分けた。1つの部分を回転させ、ヘマトクリット濃度を従来の様式で決定した。他の部分は容器に入れ、ヘマトクリット値は、図7Aの線形関数を用いて上記の通り決定した。図7Bは、反射率により決定されたヘマトクリット測定値と遠心分離により決定されたヘマトクリット測定値との間の相関を示している。やはり相対的に高い相関係数でヘマトクリット値は、実験6のアナライザにおける反射率を用いて正確に決定できることが確認された。

#### 【0099】

##### 実験セット8

先の実験のアナライザを用いて、遊離PSA（前立腺特異的抗原）は、知られたヘマトクリット値（ここでは、約15%から60%の間）および遊離PSA（ここでは、8ng/mlから10ng/mlの間）を有する全血サンプルに対するモノクローナル抗体を用いて全血から決定された。第1の実験セットにおいて、全血サンプルは、細胞成分を除くために予め遠心分離をしないで測定に使用された。図8Aに見ることができるよう、予想どおり実際のPSAシグナルは、ヘマトクリット濃度が増すとともに減少した。対照的に、血液サンプルは、細胞成分を除くための遠心分離を行った場合、PSA濃度は予想された濃度にとどまった。同様に、血液サンプルを遠心分離はしないが、上記実験6および7から確立された相関を用いて標準化した場合、PSA濃度は、実質的に同じ濃度にとどまり、遠心分離の血液サンプルに対して高い相関を示した。

#### 【0100】

もちろん、本発明の主題による方法および形態を用いて検出できる検体は、遊離のPSAに限定される必要がないことを認識すべきである。比色法アッセイ、発光法アッセイ、または蛍光法アッセイが利用できる全ての検体（特に、全血に溶解または処理される検体）が好適であると考えられることが一般に考慮されている。例えば、好適な検体としては、ペプチド類（例えば、ウィルス抗原、成長因子、CEAなど）、ホルモン類（例えば、TSHまたはテストステロン）、核酸類（例えば、腫瘍関連核酸類）、小型分子（例えば、スケジュールI～IV薬物、T4/T4チロキシンなど）が挙げられる。

#### 【0101】

##### 実験セット9

先の実験でのアナライザおよび決定された相関を用いて、遊離 P S A が、ヘマトクリット濃度の範囲外でサンプル中の P S A 濃度の範囲を超えて決定された。全血が、2つの実験セットに関する出発材料として用いられた。第1の実験セットにおいて、遊離 P S A は、先に決定された相関から得られた反射率と相関関数を用いて細胞成分の除去なしで、全血から決定された。第2の実験セットにおいて、遊離 P S A は、細胞成分の除去後、全血から決定された。図 8 B に明確に見ることができるように、2つの実験間で優れた相関が存在する。その結果、遊離 P S A は、細胞成分を予め除去せずに考慮された形態において全血から決定でき、医師は、他の場合であれば、全血の処理（例えば、遠心分離）が必要となる要件なしで彼または彼女のオフィスで遊離 P S A 試験を実施できることを認識すべきである。

10

**【0102】**

その結果、発明者ら、サンプル反応コンパートメント、それぞれ異なる第1および第2の試薬が含まれている第1および第2の試薬コンパートメント、およびシグナル検出コンパートメントなど、容器が複数の流体不連続コンパートメントを有する容器を1ステップで提供し、検体に関して細胞含有サンプルを試験する方法を考慮している。他のステップにおいて、細胞含有サンプルをサンプル反応コンパートメントに入れ、前記細胞含有サンプルを容器内で照射することにより、光散乱シグナルが創製される（光散乱シグナルが捕捉される）。なおさらなるステップにおいて、容器表面は、複数のアクチュエータを有する装置と接触し、複数の異なるセットのアクチュエータは、順序可変でかつ時間を遅らせてサンプルに第1および第2の試薬を独立して加えるように操作される。さらに他のステップにおいて、反応済みサンプルの少なくとも一部は、アクチュエータセットの少なくとも1つを用いてサンプル反応コンパートメントとサンプル検出コンパートメントとの間を移動し、検体依存シグナルが、サンプル検出コンパートメントに含まれた反応済みサンプルから読み取られ、試験結果は、検体依存シグナルおよび光散乱シグナルを用いて算出される。

20

**【0103】**

したがって他の見通しから検討し、コンパートメントの少なくとも1つが試薬を含んでいるサンプル収納コンパートメントおよびシグナル検出コンパートメントなど、複数のコンパートメントに接続された流体反応チャネルを有する容器が提供される、容器を操作する方法を発明者らは考慮している。他のステップにおいては、細胞含有サンプルをサンプル収納コンパートメントに導入し、前記細胞含有サンプルを容器内で照射することにより、光散乱シグナルを創製し、捕捉する。さらに他のステップにおいて、容器表面の第1の部分、複数の独立して操作可能なアクチュエータを有する装置と接触させ、アクチュエータの少なくとも1つが、容器の一部を圧縮することにより、サンプルの少なくとも一部を反応チャネルに移動させ、さらに他のステップにおいて、容器表面の第2の部分、容器の一部を圧縮するアクチュエータの他の1つと接触させることにより、サンプル部分の少なくとも一部と複数のコンパートメントの少なくとも2つとの間の試薬の移動を防止する。さらに他のステップにおいて、検体依存シグナルは、サンプル検出コンパートメントに含まれている反応済みサンプルから読み取られ、試験結果は、検体依存シグナルおよび光散乱シグナルを用いて算出される。

30

40

**【0104】**

このように磁気分離の特定の実施形態および適用が開示されている。しかしながら、既に記載されたものの他にもさらに多くの変更が、本明細書中の発明コンセプトから逸脱することなく可能であることが、当業者にとって明らかであるはずである。したがって、本発明の主題は、添付の請求項の精神以外に限定されるべきではない。

**【図面の簡単な説明】****【0105】**

【図1A】分離剤が、血液サンプルに加えられている好ましい実施形態を示す図である。

【図1B】赤血球分離後の図1Aの実施形態を示す図である。

【図2A】代替の実施形態を示す図である。

50

【図 2 B】図 2 A の実施形態に存在すると考えられる結合相互作用を示す図である。

【図 3】他の代替の実施形態を示す図である。

【図 4】代表的な診断容器を示す平面図である。

【図 5】図 4 の診断容器に関する代表的な分析器を示す斜視図である。

【図 6】照射用の光ガイドおよび散乱光の読取りを含むアクチュエータを備えた代表的な分析器の詳細図を示す写真である。

【図 7 A】本発明の主題による分析器を用いて得られた反射シグナルに対して測定されたヘマトクリット値の検量線を示すグラフである。

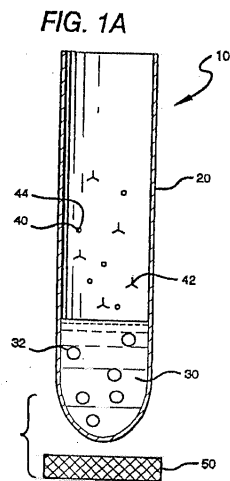
【図 7 B】回転ヘマトクリット値と本発明の主題による分析器において反射シグナルを用いて決定されたヘマトクリット値との間の相関を示すグラフである。

10

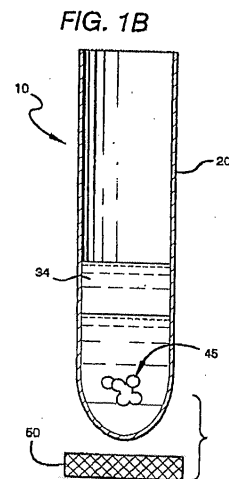
【図 8 A】種々の実験パラメータを用いた P S A 測定値を示すグラフである。

【図 8 B】本発明の主題による分析器を用いて得られた反射シグナルを用いる全血の P S A 測定値と予め調製された血漿の P S A 測定値との間の相関を示すグラフである。

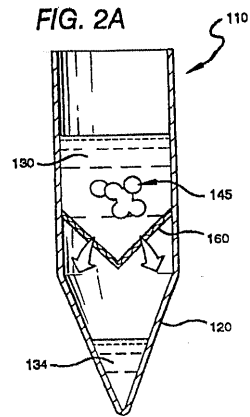
【図 1 A】



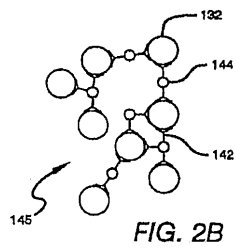
【図 1 B】



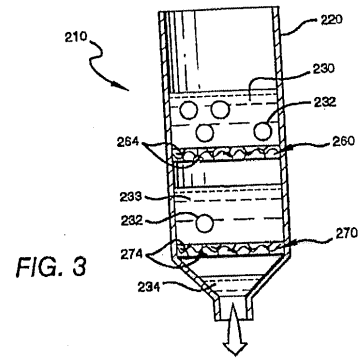
【図 2 A】



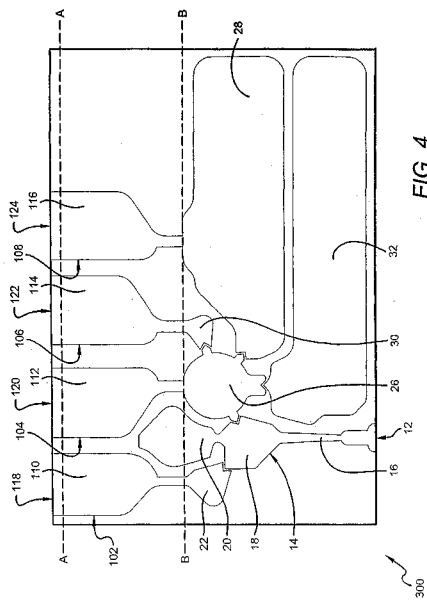
【図 2 B】



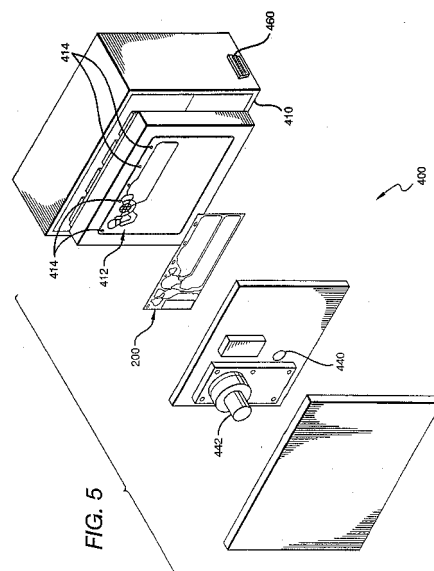
【図 3】



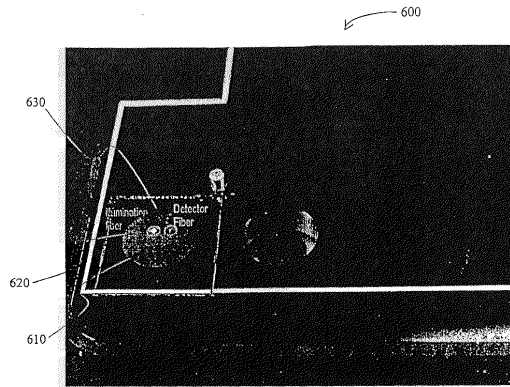
【図 4】



【図 5】



【図 6】



illumination fiber : 照射ファイバー  
Detector Fiber : 検知ファイバー

Figure 6

【図 7 A】

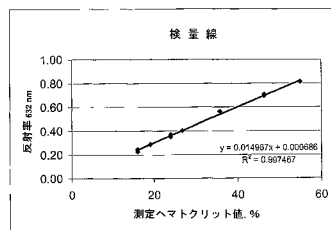


Figure 7A

【図 7 B】

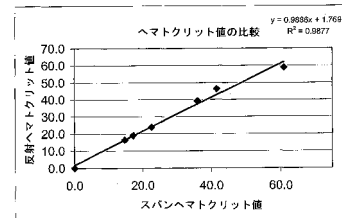


Figure 7B

【図 8 A】

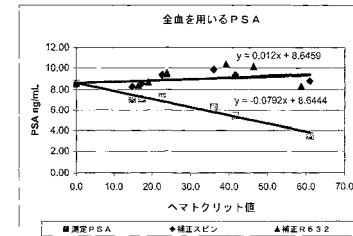


Figure 8A

【図 8 B】

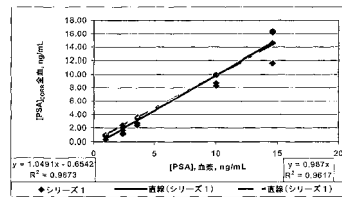


Figure 8B

---

フロントページの続き

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ワИАット・ジエームス

アメリカ合衆国、カリフォルニア・92009、カールズバッド、コルテ・デル・ノガール・2042、スイート・エー／ビー、クオリジエン・インコーポレイテッド

(72)発明者 スコット・マシユー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・92009、カールズバッド、コルテ・デル・ノガール・2042、スイート・エー／ビー、クオリジエン・インコーポレイテッド

(72)発明者 マハント・ビジャイ, ケイ

アメリカ合衆国、カルフォルニア・92562、ムリエタ、ワイルド・マスタング・ロード・42299

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開平11-104114 (JP, A)

特表2002-523779 (JP, A)

特表2000-510572 (JP, A)

特表2002-538458 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/49

G01N 21/49